

BUNDE REPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP 03 / 09892 ³
EPO-BERLIN
26-11-2003

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 11 DEC 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 06 085.5

Anmeldetag: 7. Februar 2003

Anmelder/Inhaber: Forschungsverbund Berlin e.V., Berlin/DE

Bezeichnung: Neue Spleißvariante eines Proteinkinase A-Anker-
proteins und Verwendung dieser

Priorität: 6.9.2002 DE 102 44 072.7

IPC: C 08 K 14/435

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Neue Spleißvariante eines Proteinkinase A-Ankerproteins und Verwendung dieser

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine für ein Proteinkinase A-Ankerprotein kodierende Nukleinsäuresequenz, eine Verwendung dieser Nukleinsäuresequenz in einem Fusionsprotein und ein Verfahren zur Bestimmung der Wechselwirkung des Proteinkinase A-Ankerproteins mit regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A sowie ein Verfahren zur Identifikation zellpermeabler Substanzen.

Die biologische Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern wird über die Aktivierung von Signalkaskaden, welche den Phosphorylierungsstatus von Effektorproteinen verändern, vermittelt. An diesem reversiblen Prozess sind zwei Klassen von Enzymen beteiligt: Proteinkinasen und Phosphoproteinphosphatasen. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen, welche die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste katalysieren, die Dephosphorylierung wird durch Phosphoproteinphosphatasen vermittelt. Ein Mechanismus zur Kontrolle und Regulation dieser Enzymaktivitäten ist die Kompartimentierung dieser Enzyme durch die Assoziation mit Ankerproteinen, die in der Nähe ihrer Substrate lokalisiert sind. Die Proteinkinase A (PKA) ist eine der multifunktionellen Kinasen mit einer breiten Substratspezifität, welche durch die so genannten *protein kinase A anchoring*

proteins (AKAPs) an subzellulären Strukturen verankert wird.

Bei vielen wichtigen zellulären Prozessen wie Kontraktion, Sekretion, Stoffwechsel, Gentranskription, Zellwachstum und -teilung erfolgt die Weiterleitung extrazellulärer Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, das G-Protein G_s , Aktivierung einer Adenylzyklase und Bildung des *second-messenger* zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Effekte von cAMP werden durch die cAMP-abhängige PKA vermittelt.

Die Untereinheiten der PKA werden beim Menschen von sieben verschiedenen Genen, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, kodiert. Drei Gene kodieren für die Isoformen der katalytischen Untereinheit $C\alpha$, $C\beta$ und $C\gamma$ und vier Gene für die Isoformen der regulatorischen Untereinheit $R1\alpha$, $R1\beta$, $R2\alpha$ und $R2\beta$.

Die regulatorischen Untereinheiten zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während $R1\alpha$ und $R2\alpha$ ubiquitär in den Geweben vorkommen, ist die regulatorische Untereinheit $R1\beta$ in erster Linie im Gehirn zu finden.

Die Assoziation der $R2$ -Untereinheiten mit intrazellulären Kompartimenten wird durch AKAPs vermittelt. Bei den Ankerproteinen handelt es sich um eine Gruppe funktionell verwandter Moleküle, die durch die Interaktion mit Typ I bzw. Typ II der regulatorischen Untereinheiten ($R1$ bzw. $R2$) des PKA-Holoenzym charakterisiert sind. Die ersten Ankerproteine wurden bei der Affinitätschromatographischen Reinigung der R -Untereinheiten über cAMP-Sepharose isoliert. Diese assoziierten Proteine zeigten auch nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran eine $R2$ -Bindung. Auf dieser Beobachtung beruht auch die bisherige Methode

(RII-overlay) zur Detektion von AKAPs. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Western Blot, bei dem statt eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden.

Zur funktionellen Bedeutung der RI-AKAP-Interaktion ist noch wenig bekannt. Auch wenn RI α hauptsächlich zytoplasmisch lokalisiert ist, zeigen verschiedene Studien eine Verankerung *in vivo*. Dabei scheint die dynamische Verankerung der RI α -Untereinheiten im Gegensatz zur statischen Verankerung der RII-Untereinheiten von entscheidender Bedeutung für die Zelle zu sein. So wurde die Assoziation der RI-Untereinheiten mit der Plasmamembran von Erythrozyten und aktivierten T-Lymphozyten beschrieben. Bei der cAMP-vermittelten Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die PKA Typ I könnte die Lokalisation des Enzyms möglicherweise auch durch AKAPs vermittelt werden. In knockout-Mäusen, die im Skelettmuskelgewebe keine regulatorischen Untereinheiten Typ II exprimieren, binden die RI α -Untereinheiten an ein mit Kalziumkanälen assoziiertes AKAP und erhalten so die normale, cAMP-abhängige Kanal-leitfähigkeit durch die korrekte Verfügbarkeit der katalytischen Untereinheiten der PKA.

In vivo konnte weiterhin gezeigt werden, dass die katalytischen Untereinheiten in der Zelle bevorzugt mit den RII-Untereinheiten assoziieren und Typ I-PKA-Holoenzym gebildet wird, wenn die Menge der freien katalytischen Untereinheiten die Menge der freien RII-Untereinheiten übersteigt.

Die Spezifität in der PKA-Verankerung wird durch die *targeting*-Domäne erreicht, ein Strukturmotiv, das im Gegensatz zu der *anchoring*-Domäne weder in der Sequenz noch in der Struktur der AKAPs konserviert ist. So werden AKAPs

durch Protein-Protein-Interaktionen an strukturelle Elemente in der Zelle und durch Protein-Lipid-Interaktionen an Membranen verankert.

In der Literatur sind verschiedene AKAPs beschrieben, die mit unterschiedlichen zellulären Kompartimenten assoziieren, so zum Beispiel mit den Zentrosomen, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, der Plasma- und Kernmembran und mit Vesikeln.

Die genauen Mechanismen der Verankerung sind bisher nur für einige AKAPs bekannt. So wird das herzmuskelspezifische Ankerprotein mAKAP durch eine Region mit drei spektrinartigen Wiederholungssequenzen an der perinukleären Membran der Kardiomyozyten verankert. Zwei Isoformen der AKAP15/18 werden durch Lipidmodifikationen (Myristoylierung und Palmitoylierung) an der Plasmamembran verankert. Drei polybasische Regionen in der *targeting*-Domäne des AKAP79 sind an der Lokalisation des Proteins an der inneren postsynaptischen Membran (PSD, *postsynaptic density*) beteiligt.

Die AKAPs wurden zuerst durch die Interaktion mit der PKA charakterisiert. Einige dieser Proteine können jedoch auch andere an der Signaltransduktion beteiligte Enzyme binden. Durch die gleichzeitige Verankerung von Enzymen, die gegensätzliche Reaktionen katalysieren, wie zum Beispiel Kinasen und Phosphatasen, können diese, auch als *scaffolding* (gerüstbildende) Proteine bezeichneten AKAPs ganze Signalkomplexe in der Nähe bestimmter Substrate lokalisieren und so zur Spezifität und Regulation der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale beitragen. AKAP79 war das erste AKAP, für das die Interaktion mit mehreren Enzymen nachgewiesen werden konnte. Dieses Protein bindet die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die Protein-

phosphatase Calcineurin (PP2B), wobei jedes Enzym in gebundenem Zustand inhibiert ist. Da unterschiedliche Signale für die Aktivierung jedes einzelnen Enzyms notwendig sind, können an dieser Stelle verschiedene *second messenger* wie cAMP, Kalzium und Phospholipide zusammentreffen. Weitere Beispiele sind das AKAP220, welches die PKA und die Proteinphosphatase PP1 an den Peroxisomen lokalisiert und das AKAP Yotiao, das neben der PKA ebenfalls die Proteinphosphatase PP1 bindet. Das AKAP CG-NAP bindet nicht nur die PKA und die Proteinphosphatase PP1, sondern auch noch die Rho-abhängige Kinase PKN (NGF (nerve growth factor) -aktivierte Proteinkinase) und die Proteinphosphatase PP2A.

Auch andere Proteine können mit AKAPs assoziieren, so bindet Ezrin, ein Mitglied der zytoskelett-assoziierten ERM-Familie Ezrin, Radixin und Moesin, das als AKAP identifiziert wurde, an ein Protein (EBP50/NHERF), welches an der Regulation des Natrium-Protonen-Transportes in der apikalen Membran von Epithelzellen beteiligt ist. AKAPs vermitteln die Modulation der Leitfähigkeit der Ionenkanäle durch die Lokalisation der Proteinkinasen und -phosphatasen in der Nähe bestimmter Kanaluntereinheiten, die wahrscheinlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden.

Die Aktivität des NMDA-Rezeptors wird durch das AKAP Yotiao, welches auch die Proteinphosphatase PP1 bindet, moduliert. Die in gebundenem Zustand aktive Phosphatase limitiert die Kanalleitfähigkeit des NMDA-Rezeptors, bis die PKA durch cAMP aktiviert wird und den Ionenkanal oder ein assoziiertes Protein phosphoryliert, wodurch die Leitfähigkeit rapide ansteigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass myristoylierte Ht31-Peptide, die die Interaktion zwischen PKA und AKAP inhibieren, die cAMP-abhängige

Inhibition der Interleukin⁴ 2-Transkription in Jurkat-T-Zellen aufheben und dass S-Ht31-Peptide die Spermienmotilität einschränken.

Auch bei den wichtigen komplexen biologischen Prozessen, wie die durch das Hormon GLP-1 (*glucagon-like peptide*)-vermittelte Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und in RINm5F-Zellen (klonale β -Zelllinie der Ratte) sind AKAPs beteiligt. Die Aktivierung der PKA durch GLP-1 führt zur Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen und begünstigt die Exozytose von Insulin aus sekretorischen Granula. Die Ht31-Peptid-vermittelte Inhibition der PKA-Verankerung führte zu einer deutlichen Verringerung der Insulinsekretion. Dabei wurden weder die cAMP-Bildung noch die Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA durch die Peptide beeinflusst. Weiterhin konnte nach Expression des wildtypischen AKAP18 α in RINm5F-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, welche AKAP18 α nicht exprimierten, eine Erhöhung der Insulinsekretion nach GLP-1-Applikation nachgewiesen werden.

Bisher wurde der Nachweis, dass es sich bei einem neuen Protein um ein AKAP handelt, durch Kopräzipitation erbracht. Dazu wurde ein Antikörper gegen das Kandidatenprotein hergestellt, um es aus Zellen oder Gewebe, in denen es exprimiert wird, immunpräzipitieren. Anschließend wurde das Vorhandensein von regulatorischen und/oder katalytischen PKA-Untereinheiten im Präzipitat mittels Western Blot untersucht. Die Anwesenheit der PKA-Untereinheiten im Präzipitat spricht dafür, dass das Kandidatenprotein in vivo als AKAP fungiert. Der Nachweis kann auch umgekehrt erbracht werden, indem die PKA-Untereinheiten immunpräzipitiert werden und anschließend das AKAP im Präzipitat nachgewiesen wird.

Dieser experimentelle Ansatz erlaubt aber keinen Rückschluss auf die intrazelluläre Lokalisation oder auf die in vivo-Situation eines AKAP-PKA-Komplexes. Es ist außerdem nicht möglich, die zeitliche und räumliche Auflösung von Interaktionen zu analysieren. Weiterhin ist es derzeit mit den bekannten Verfahren nicht möglich, spezifische AKAP-Inhibitoren oder -Aktivatoren zu identifizieren.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue Nukleinsäuresequenzen, die für Strukturen kodieren, zur Verfügung zu stellen, die in Verfahren eingesetzt werden können, in denen die Interaktion zwischen AKAP und PKA in vivo detektiert wird, wobei die Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation dieser Interaktion erhalten werden können und die weiterhin in Verfahren eingesetzt werden können, mit denen membranpermeable Substanzen, insbesondere Peptide, detektierbar sind.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung einer isolierten Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 oder deren komplementären Nukleotidsequenzen,
- b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nukleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

- e) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eingesetzt werden können, um die Interaktion von AKAP und PKA Untereinheiten in vivo zu detektieren, wobei ein AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zugeordnet werden kann.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz funktionsanalog zu sein, zumindest zu 40 % homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nukleinsäuresequenzen bzw. den mit diesen Nukleinsäuresequenzen hybridisierenden Sequenzen funktionsanalog zu sein, dass die kodierten homologen Strukturen bei der Interaktion mit PKA-Untereinheiten Merkmale aufweisen, die Rückschlüsse auf die in vivo Situation und die zelluläre Lokalisation zulassen sowie auf die Identifizierung spezifischer AKAP-Inhibitoren.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nukleinsäuremolekül mindestens 60 %, vorzugsweise 70 %, bevorzugt 80 %, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie zu dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül eine genomische DNA und/oder eine RNA; besonders bevorzugt ist das Nukleinsäuremolekül eine cDNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor umfasst. Die Erfindung betrifft ganz besonders bevorzugt auch ein Polypeptid, was durch ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kodiert wird. Ein solches Polypeptid ist bevorzugt eine neue Spleißvariante des AKAP18 (AKAP18δ).

Die Erfindung betrifft auch das Polypeptid bzw. Protein, das durch das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kodiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nukleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nukleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so wechselwirken, dass eine Detektion dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nukleinsäuren sein, die an die genannten Nukleinsäuremoleküle oder Polypeptide binden, wie z. B. Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nukleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper. Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül ein Antikörper, ein Antikörperfragment

und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.

Die Antikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere AKAP18δ, spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (z. B. oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörper-Fragmente, wie Fab, F(ab')₂ und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

- (1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
- (2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;
- (3) F(ab')₂, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; F(ab')₂ ist ein Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

- (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und
- (5) Einzelketten-Antikörper ("SCA"), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf dem Polypeptid, insbesondere AKAP188; Epitop-Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächen-Gruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

Die Erfindung betrifft auch Vakzine oder eine pharmazeutische Zusammensetzung, die das Nukleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das Polypeptid und/oder das Erkennungsmolekül gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Bei dem pharmazeutisch akzeptablen Träger handelt es sich um an sich bekannte pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Bei diesen, dem Fachmann an sich bekannten Zusatz- und Trägerstoffen, kann es sich auch um Liposomen bzw. um in der Gentechnik bekannte Strukturen bzw. Lösungen und/oder Puffergemische oder um andere Substanzen aus dem Bereich der Galenik handeln.

Weiterhin betrifft die Erfindung einen Kit, der die Nukleinsäuren, die Vektoren, die Wirtszelle, das Polypeptid, das Erkennungsmolekül und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung umfasst. Der Kit kann z. B. als Diagnosekit oder als Detektionskit verwendet werden, um insbesondere AKAP-Inhibitoren oder die AKAP-PKA-Interaktion zu detektieren.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion umfassend die Schritte

- a) Bereitstellung eines ersten Vektors, insbesondere eines Plasmids, umfassend ein Nukleinsäuremolekül kodierend (i) ein AKAP, insbesondere ein AKAP18 δ , und (ii) einen ersten Marker, insbesondere ein fluoreszierendes Protein,
- b) Bereitstellung eines zweiten Vektors, insbesondere eines Plasmids, umfassend ein zweites Nukleinsäuremolekül kodierend (i) eine regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase, bevorzugt RII α , RII β , RI α oder RI β , und (ii) einen zweiten Marker, insbesondere ein fluoreszierendes Protein,
- c) Einführen des ersten und zweiten Vektors in eine Zelle, wobei die Zelle transfiziert wird, und
- d) Durchführen einer Fluoreszenzresonanzenergietransfer-(FRET)-Messung, wobei die AKAP-PKA-Interaktion detektiert wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es überraschenderweise möglich, die AKAP-PKA-Interaktion, bevorzugt eine AKAP18-PKA-, besonders bevorzugt eine AKAP18 δ -PKA-Interaktion, in einer lebenden Zelle zu visualisieren und somit

den AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zuzuordnen.

In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zwei Vektoren bzw. Plasmide bereitgestellt, wobei z. B. das erste Plasmid das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, welches für AKAP18 δ kodiert, und mindestens ein weiteres Nukleinsäuremolekül umfasst, das für einen Marker, vorzugsweise für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Das zweite Plasmid umfasst ebenfalls mindestens zwei Nukleinsäuremoleküle, wobei ein erstes Nukleinsäuremolekül die regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase, vorzugsweise RII α , kodiert und ein weiteres Nukleinsäuremolekül einen zweiten Marker, insbesondere ein zweites fluoreszierendes Fluoreszenzprotein, kodiert. Das erste und das zweite fluoreszierende Protein können hierbei insbesondere so ausgewählt werden, dass sie bei einer ausreichenden räumlichen Nähe zueinander zu einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) befähigt sind. Demgemäß kann es sich bei dem ersten fluoreszierenden Protein beispielsweise um das Cyan-fluoreszierende Protein (CFP) und bei dem zweiten fluoreszierenden Protein um das Yellow-fluoreszierende Protein (YFP) handeln. Dem Fachmann ist selbstverständlich bekannt, dass er vielfältige Moleküle verwenden kann, um eine messbare Interaktion zwischen Fluoreszenzmarkern wie z. B. einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer zu ermöglichen oder einen bestehenden Fluoreszenzresonanzenergietransfer so zu modifizieren, beispielsweise zu inhibieren, dass eine Detektion einer Wechselwirkung von mindestens zwei Markermolekülen, insbesondere Fluoreszenzmarkern, möglich ist. Hierzu ist es erforderlich, dass der erste und zweite Vektor, die insbesondere Plasmide sind, mindestens eine Struktur aufweisen, die messbar als Markierung detektiert werden kann. Der Begriff Marker oder Markierung betrifft im Sinne der Erfindung alle Strukturen oder

Verfahren, die zur Erzeugung eines nachweisbaren, vorzugsweise quantifizierbaren Signals verwendet werden können, und die insbesondere an eine Nukleinsäure oder ein Protein bzw. ein Fragment hiervon gebunden oder wirkverbindbar sind. Die Marker oder die Markierungen können insbesondere mittels Fluoreszenz nachweisbare Signale erzeugen. Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Lehre wird die Wechselwirkung bzw. eine Modifikation der Wechselwirkung - z. B. als Inhibierung - bevorzugt in Form einer FRET-Messung detektiert. Selbstverständlich ist es auch möglich, mit Hilfe von Radioaktivität, Kolorimetrie, Gravimetrie, Röntgenbeugung oder -absorption, Magnetismus oder enzymatischer Aktivität Signale zu erzeugen, die isoliert gemessen oder im Zusammenhang mit einer Fluoreszenz bzw. einem Fluoreszenzresonanzergietransfervorgang Signale erzeugen, inhibieren oder modifizieren, so dass eine Interaktion von mindestens zwei biologischen Komponenten, vorzugsweise von zwei Proteinen, besonders bevorzugt zwischen einer Proteinkinase, bevorzugt PKA, und einem Proteinkinase A-Ankerprotein, bevorzugt AKAP18δ, nachgewiesen werden kann. Eine Sonde im Sinne der Erfindung ist z. B. eine Nukleinsäure oder Aminosäuresequenz, die an einem oder beiden Enden oder intern mindestens eine Markierung aufweist, wobei die Markierung bevorzugt ein zur Fluoreszenz befähigter Farbstoff oder Marker oder ein die Fluoreszenz unterdrückender Farbstoff oder Marker ist. Eine Sonde im Sinne der Erfindung kann daher aber auch eine Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz sein, die mindestens eine Markierung aufweist, die in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu modifizieren, insbesondere zu inhibieren. Eine solche Sonde kann beispielsweise eine Quencherstruktur sein, die die Fluoreszenz beispielsweise eines Markers oder Farbstoffs, z. B. eines Reporterfarbstoffs, im Zusammenhang mit einer Interaktion zwischen zwei Molekülen so beeinflusst, dass eine messbare Signal-

änderung erzeugt werden kann. So kann beispielsweise diese Quencherstruktur so ausgebildet sein, dass durch die Wechselwirkung mit einem Fluoreszenzfarbstoff kein Fluoreszenzsignal oder aber kein Energietransfersignal detektierbar ist, wenn die zur Fluoreszenz befähigte Struktur und die zur Quenchung befähigte Struktur die hierfür erforderliche räumliche Nähe, beispielsweise bei einer Interaktion von Proteinase A-Ankerproteinen und Proteinkinasen aufweisen; in einem solchen System wäre ein Fluoreszenzsignal bzw. ein nicht-modifiziertes Fluoreszenzsignal so lange detektierbar, wie es zu einer Interaktion zwischen den markierten Strukturen kommt. Die Begriffe Quenching, Fluoreszenzresonanzenergietransfersignal oder einfach Fluoreszenz betreffen demgemäß Strukturen und Verfahren, durch die, falls ein fluoreszierendes und ein anderes fluoreszierendes bzw. ein quenchendes Molekül räumlich nahe benachbart liegen, bei einer Anregung eines dieser Moleküle ein wesentlicher Teil der Energie des angeregten Zustandes ohne Strahlung auf den Quencher übertragen wird oder mit einer messbaren Strahlung an das System abgegeben wird. Auf den Quencher übertragene Energie kann beispielsweise ohne Strahlung verloren gehen oder in einer anderen Emissionswellenlänge als die des fluoreszierenden Moleküls emittiert werden. Das heißt, die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen oder den sie kodierenden Nukleinsäuren, insbesondere solchen, die mit der Proteinkinase A und dem Proteinkinase A-Ankerprotein assoziiert sind, kann entweder durch eine emittierende Strahlung oder aber durch die strahlungslose Übertragung der Energie auf einen Quencher detektiert werden.

Eine praktische Anleitung für die Auswahl geeigneter Fluoreszenz-Quencher-Paare für bestimmte Sonden ist in der Literatur verfügbar und in den nachstehenden Referenzen beispielhaft dargestellt: Pesce et al., Hrsg., Fluorescence

Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971), White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970). Die Literatur enthält auch Referenzen, die ausführliche Listen von fluoreszenten und chromogenen Molekülen und deren relevante optische Eigenschaften für die Auswahl von Fluoreszenz-Quencher-Paaren bereitstellen; vgl. z.B. Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2. Auflage (Academic Press, New York, 1971), Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976), Bishop, Hrsg., Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972), Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992). Ferner findet sich in der Literatur eine ausführliche Anleitung für die Derivatisierung von Fluoreszenz- und Quencher-Molekülen für die kovalente Bindung über gewöhnliche reaktive Gruppen, die an ein Oligonukleotid angefügt werden können; vgl. US-PS 3,996,345, US-PS 4,351,760.

Beispielhafte Fluoreszenz-Quencher-Paare können aus Xanthen-Farbstoffen, einschließlich Fluoresceinen und Rhodamin-Farbstoffen ausgewählt werden. Viele geeignete Formen dieser Verbindungen sind kommerziell erhältlich und enthalten Substituenten auf ihren Phenylgruppen, die als Bindestelle oder als Binfunktionalität für die Bindung an ein Oligonukleotid verwendet werden können. Eine weitere Gruppe von fluoreszenten Verbindungen sind Naphthylamine mit einer Aminogruppe in der alpha- oder beta-Position. Diese Naphthylamino-Verbindungen umfassen 1-Dimethylaminonaphthyl-5-sulfonat, 1-Anilino-8-naphthalensulfonat und 2-p-Toluidinyl-6-naphthalensulfonat. Andere Farbstoffe umfassen 3-Phenyl-7-isocyanatocoumarin, Acridine wie 9-Isothiocyanatoacridin-Orange, N-(p-(2-Benzoxazolyl)-phenyl)-maleimid, Benzoxadiazole, Stilbene, Pyrene. Bevorzugte Fluorophore sind weiterhin SYBR Green, Hex, TET, VIC,

JOE, NED, Redmond Red, Alexa Red, Cascade Blue, Yakima Yellow, Cy3, Cy3.5, Tamra/Cy3, Texas Red, ROX, Cy5, Cy5.5, Carboxyrhodamine, LC705 und/oder LC640. Als Quencher können beispielsweise weiterhin eingesetzt werden Tamra, Rhodamin, BHQ1 bis BHQ3, Dansyl, Dabcyl, ElleQuencher und/oder Methylorange. Bevorzugt kann auch eine Konjugation der Nukleinsäureproben mit Minor Groove Binder (MGB) sein. Derartige Strukturen sind beispielsweise in Kutayavin et al., 2000, Nucleic Acids Research beschrieben und sind in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen.

Erfindungsgemäß kann man zwei Arten von Quencherprozessen oder Prozessen, die eine Fluoreszenzstrahlung modifizieren, unterscheiden, einmal die dynamische Fluoreszenzlöschung durch Kollisionsprozesse und die statische Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung zwischen dem Fluorophor, das heißt dem Marker oder der Sonde und den Quencher- oder Löscher-Molekülen des Sonden-Quenchers. Das Quenching führt demgemäß zu einer Erniedrigung der Quantenausbeute, die durch Fluoreszenzanregung der markierten Sonde detektiert werden kann. Es ist aber beispielsweise auch möglich, dass die Sonden bei einer sehr hohen Konzentration, beispielsweise auf einem bestimmten Nukleinsäureabschnitt, zum so genannten Selbstquenching neigen, das heißt, dass die einzelnen Moleküle in ihrer Bewegung so gestört werden, dass ebenfalls ein Quenchingeffect - bedingt durch die hohe Sondendichte - auftritt.

Denn im Sinne der Erfindung kann z. B. ein separat generiertes Fluoreszenzsignal, ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Signal als auch ein "gequenches" Signal dazu dienen, eine AKAP-PKA zu detektieren, bevorzugt ist ein FRET-Signal. Das FRET-Signal wird insbesondere durch die Verwendung der Fluoreszenzstoffe CFP und YFP gewonnen.

Mit den beiden bereitgestellten Plasmiden wird eine Zelle transfiziert. Die Transfektion in Sinne der Erfindung kann über chemische, physikalische und/oder biologische Transfektionsmethoden vorgenommen werden. Die chemische Transfektion kann beispielsweise durch den Einsatz von DEAE-Dextran, durch Dendrimere oder durch die Verwendung von Calciumphosphat vorgenommen werden. Bei der physikalischen Transfektion ist es beispielsweise möglich, mit Hilfe der Elektroporation die Membranen der Zellen so zu modifizieren, dass sie die zu transfizierende Plasmid-DNA aufnehmen. Eine weitere Methode der physikalischen Transfektion ist beispielsweise die Mikroinjektion oder die Einschleusung von DNA durch Beschuss mit beispielsweise Goldpartikeln. Methoden der biologischen Transfektion sind beispielsweise die rezeptorvermittelte Transfektion, die durch virale Komponenten unterstützte rezeptorvermittelte Transfektion und die Lipofektion. Dem Fachmann sind verschiedene Methoden zur Transfektion bekannt. Die Zellen, an denen die Transfektion vorgenommen werden kann, können prokaryotische oder eukaryotische Zellen sein, beispielsweise Bakterien-, Hefe-, Insekten-, Pflanzen- oder Säugerzellen oder aber auch Organismen wie transgene Tiere oder Pflanzen. In den eukaryotischen Systemen sind die Säugerzelllinien NS0, SP2/0, CHO-K1, CHO dhfr-, COS-1, COS-7, K562, Percy 6 oder bevorzugt HEK293-Zellen bevorzugt CD8-Zellen, LCCPK1, HeLazellen, MDCK2-Zellen, MCF7, Fibroblasten, MCF7, NIH3T3.

Nachdem die Zellen mit beiden Plasmiden unter den dem Fachmann bekannten Bedingungen kotransfiziert wurden, werden die beiden Fusionsproteine aus AKAP und erstem fluoreszierenden Protein und aus der regulatorischen Untereinheit einer Proteinkinase und dem zweiten fluoreszierenden Protein exprimiert. Sofern die exprimierten Fusionsproteine interagieren, kann dies auf Grund der Wechselwirkung der

fluoreszierenden Proteine mit der Fluoreszenzresonanz-energietransfer-Technik, insbesondere in lebenden Organismen, wie in Zellen detektiert werden. Die Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Technik beruht auf einem Energietransfer des ersten fluoreszierenden Proteins zu dem zweiten fluoreszierenden Protein, der jedoch nur dann zustande kommt, wenn sich beide Fusionsproteine in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Die Fusionsproteine erreichen diese Nähe insbesondere dann, wenn das AKAP-Protein direkt an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase bindet. In diesem Fall kann ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer nachgewiesen werden.

Das System kann auch für die Identifikation von Substanzen genutzt werden, die die Interaktion zwischen AKAP und regulatorischen Untereinheiten, bevorzugt $RII\alpha$, aber auch $RII\beta$, $RI\alpha$ und β der PKA, inhibieren.

Durch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Fachmann das Verfahren beliebig modifizieren. Insbesondere ist es möglich, zu überprüfen, ob bestimmte Moleküle die Wechselwirkung von AKAP und PKA, insbesondere $AKAP18\delta$ und $RII\alpha$, beeinflussen. Hierzu kann das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise einmal in Gegenwart und einmal ohne das zu untersuchende Molekül durchgeführt werden, wobei der Vergleich des mit dem und ohne das zu untersuchende Molekül durchgeführten Verfahrens einen Hinweis auf den Inhibitionscharakter des Moleküls gibt. Sofern z. B. kein FRET-Signal in Gegenwart des Moleküls gemessen wird, ist dies ein Hinweis darauf, dass das Molekül die Wechselwirkung zwischen AKAP und PKA inhibiert.

Dem Fachmann ist bekannt, durch welche Kontrollversuche er ausschließen kann, dass das Molekül den FRET selbst unterdrückt; weiterhin ist ihm bekannt, wie er detektieren kann,

ob das Molekül AKAP, PKA-Untereinheiten oder deren spezielle Wechselwirkung beeinflusst, vorzugsweise inhibiert.

Die Identifizierung spezifischer AKAP-Inhibitoren hat ein großes therapeutisches Potential. AKAP-PKA-Interaktionen spielen bei verschiedenen exozytötischen Prozessen eine Rolle, deren Fehlregulation zur Entstehung von Krankheiten wie Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Magenulzera oder Schilddrüsenerkrankungen führt. Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu einer PKA-vermittelten Hyperphosphorylierung eines Ionenkanals, des Ryanodinrezeptors (Calciumkanal). Substanzen, die bestimmte AKAP spezifisch inhibieren, könnten als Pharmaka bei diesen Erkrankungen eingesetzt werden.

Das Verfahren ist außerdem geeignet, die Membranpermeabilität von Peptiden zu erfassen. Bislang gibt es keine Möglichkeit einen Membrantransfer von Peptiden direkt nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Dies kann insbesondere erreicht werden, indem ein Konjugat aus dem zu untersuchenden Molekül, insbesondere ein Peptid und S-Ht31 bzw. ein Gemisch mit dem Peptid Ht31 hergestellt wird. Es ist jedoch jede RII-Bindungsdomäne jedes AKAPs möglich.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird die Zelle mit einem membranpermeablen Peptid in Kontakt gebracht. Hierbei ist es beispielsweise möglich, dass die Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Messung einmal ohne Zugabe des membranpermeablen Peptids und einmal mit Zugabe des membranpermeablen Peptids durchgeführt wird, wodurch detektiert werden kann, ob das membranpermeable Peptid die AKAP-PKA-Interaktion modifiziert, insbesondere unterbindet. Eine kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Signals während der Messung bedeutet beispielsweise eine Inhibition der Interaktion zwischen AKAP

und der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase in Gegenwart des membranpermeablen Peptids. Es ist weiterhin auch möglich, bekannte membranpermeable Peptide einzusetzen, die die Interaktion zwischen AKAP und PKA inhibieren, wobei bei den membranpermeablen Peptiden bestimmte Modifikationen, wie beispielsweise Aminosäuredeletionen oder Substitutionen, untersucht werden, um einen Hinweis zu erhalten, welche Aminosäuren in einem membranpermeablen Peptid essentiell sind, um die AKAP-PKA-Interaktion zu unterdrücken bzw. zu fördern.

Das Neue des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Visualisierung der AKAP-PKA-Interaktion in einer lebenden Zelle und in der Möglichkeit, den AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zuzuordnen.

Das Verfahren ist jedoch sehr viel breiter verwendbar. Es ermöglicht ein Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation und quantitativen Analyse von Substanzen, die die AKAP-PKA-Interaktion beeinflussen. Darüber hinaus kann die Membrangängigkeit von Peptiden bestimmt werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des Vektors, der Wirtszelle, des Polypeptids, des Erkennungsmoleküls, der pharmazeutischen Zusammensetzung, des Kits und/oder des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion, einer AKAP- und/oder PKA-Inhibition und/oder eines membranpermeablen Peptids. Durch die Bereitstellung der genannten erfindungsgemäßen Strukturen und Verfahren hat der Fachmann die Möglichkeit, diese in zahlreichen Bereichen der Grundlagenforschung und Klinik einzusetzen. Es kann beispielsweise geprüft werden, ob ein Molekül ein AKAP- oder PKA-Inhibitor ist. Weiterhin kann geprüft werden, ob ein Molekül die Wechselwirkung von AKAP und PKA modifiziert.

Weiterhin kann detektiert werden, ob ein Molekül, insbesondere ein Peptid, membranpermeabel ist.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Beispiele

Es wurde zunächst die cDNA einer neuen Spleißvariante des Proteinkinase A-Ankerproteins (AKAP) AKAP18 identifiziert und isoliert (Fig. 1). Diese Variante wird als AKAP18 δ bezeichnet. Die AKAP18 δ -cDNA wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pECFP (BD Biosciences, Clontech Heidelberg) kloniert. Die cDNA der regulatorischen Untereinheit RII α der humanen Proteinkinase A, die von Prof. Dr. K. Tasken (Universität Oslo) zur Verfügung gestellt wurde, wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pEYFP (BD Biosciences, (Clontech, Heidelberg) kloniert. Eukaryotische HEK293-Zellen (GBF, Braunschweig) wurden mit den Plasmiden kotransfiziert.

Die Interaktion der exprimierten Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP wurde mittels der FluoreszenzResonanzEnergieTransfer (FRET)-Technik in den HEK293-Zellen gemessen (schematische Darstellung in Fig. 3). Die FRET-Signale beruhen auf einem Energietransfer von CFP zu YFP, der nur zustande kommt, wenn sich beide Proteine in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (< 10 nm). CFP und YFP erreichen diese Nähe nur, wenn AKAP18 δ die RII α -Untereinheit direkt bindet. In diesem Fall kann ein FRET nachgewiesen werden. Die Spezifität der Interaktion von AKAP18 δ und RII α kann dadurch überprüft werden, dass FRET in Gegenwart des membranpermeablen Peptids S-Ht31, das die Interaktion zwischen dem AKAP und der RII-Untereinheit

verhindert, gemessen wird. Eine kontinuierliche Abnahme des FRET-Signals während der Messung bedeutet eine Inhibition der Interaktion zwischen AKAP18 δ und RII α .

Die Sequenz des Peptids S-Ht31 entspricht der der PKA-Bindungsdomäne (RII-Bindungsdomäne) des AKAP Ht31. Es bildet eine amphipathische Helix aus und bindet kompetitiv an die regulatorischen PKA-Untereinheiten. Dadurch verhindert es die Interaktion mit AKAP18 δ . Die Membranpermeabilität erhält das Peptid durch die Kopplung an einen Stearatrest am N-Terminus (Klussmann et al. J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999). Peptide mit der gleichen Aminosäuresequenz (Ht31), die keinen Stearatrest tragen und damit nicht membranpermeabel sind, verändern das FRET-Signal in dem System nicht. Ebenso verändert Stearat-gekoppeltes S-Ht31-Peptid, das durch Einfügen von zwei Prolinen, die die amphipathische Helix stören, das FRET-Signal nicht.

Teil der Charakterisierung eines neu identifizierten AKAP ist der Nachweis, dass es in vivo als AKAP, das heißt als PKA-Interaktionspartner, fungiert. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, die Interaktion von AKAP18 δ und den RII α -Untereinheiten der PKA in lebenden Zellen nachzuweisen. Es ist damit dazu geeignet, den Nachweis zu erbringen, dass AKAP18 δ als AKAP in vivo fungiert. Gleichzeitig lässt das System Rückschlüsse auf die intrazelluläre Lokalisation des AKAP18 δ -RII α -Komplexes zu.

AKAP sind eine Familie von über 50 Proteinen, deren Funktion bislang nicht durch spezifisch interagierende Substanzen manipuliert werden kann. Das Peptid S-Ht31, mit dem die Bindung von AKAP18 δ und RII α inhibiert wurde (s.o.), ist bisher die einzige bekannte Substanz, die eine AKAP-Funktion beeinflusst. Es inhibiert die AKAP-PKA-Interaktion, allerdings entkoppelt es die Bindung

zwischen jeglichem AKAP und allen regulatorischen PKA-Untereinheiten. Mit diesem entwickelten System sollen membranpermeable Peptide sowie niedermolekulare, nicht-peptidische Substanzen in gezielten Hochdurchsatzuntersuchungen mittels FRET-Messungen identifiziert werden, die die Interaktion zwischen AKAP18 δ und RII α spezifisch inhibieren.

Herstellung von Plasmiden, die für die Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodieren

Die kodierende Region der von uns identifizierten AKAP18 δ -cDNA (Fig. 1; Sequenz AKAP18 δ) wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurden forward-Primer (Position in AKAP18 δ : bp 57-76) mit der Sequenz 5' CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG GAG CGC CCC GCC GCG GG 3' und reverse-Primer (Position in AKAP18 δ : bp 1095 - 1118) mit der Sequenz 5' GGC GAC CGG TGG ATC CCG GGC CCG GTT GTT ATC ACT GCC ATC GCC 3', die eine EcoRI- bzw. eine BamHI-Restriktionsschnittstelle tragen, eingesetzt. Als Polymerase wurde der Advantage cDNA polymerase-Mix nach Herstellerangaben eingesetzt. Der benötigte 10x PCR-Puffer wurde mit dem Advantage cDNA polymerase-Mix mitgeliefert. Die Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurden als dNTP-Mix in den PCR-Ansatz pipettiert (Reaktionsansatz siehe unten).

Die für RII α kodierende cDNA wurde mittels PCR aus dem Plasmid amplifiziert. Dazu wurden forward-Primer (Position in RII α : bp 190 - 210) mit der Sequenz 5' TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG AGC CAC ATC CAG ATC CCG 3' und reverse-Primer (Position in RII α : bp 1382 - 1401) mit der Sequenz 5' GAC CGG TGG ATC CCG GGC CTG CCC GAG GTT GCC CAG AT 3', die eine XhoI- bzw. eine BamHI-Restriktionsschnittstelle tragen, eingesetzt. Als Polymerase wurde

wieder der Advantage cDNA polymerase-Mix eingesetzt. Ebenso wurden der oben beschriebene 10x PCR-Puffer und der dNTP-Mix eingesetzt.

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation von AKAP18 δ und RII α wurden wie folgt angesetzt:

DNA	5 μ l
dNTP-Mix [10 μ M]	1 μ l
Forward-Primer [10 μ M]	1 μ l
Reverse-Primer [10 μ M]	1 μ l
Advantage cDNA polymerase-Mix (5 Einheiten/ μ l)	0,2 μ l
H ₂ O	<u>41,8 μl</u>
Gesamtvolumen	50 μ l

Reaktionsbedingungen:

1 Zyklus	95 °C, 5 min
30 Zyklen	94 °C, 30 sec
	58 °C, 30 sec
	72 °C, 2 min
1 Zyklus	72 °C 10 min
4 °C, ∞	

Das erhaltene AKAP18 δ -cDNA-Amplifikat (Länge: 1061 bp) wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI behandelt, das erhaltene RII α -cDNA-Amplifikat (Länge: 1211 bp) mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI. Anschließend wurden die Ansätze in einem Agarosegel aufgetrennt und die AKAP18 δ - bzw. RII α -Amplifikate mittels der GeneClean-Methode aus dem Gel eluiert.

Die AKAP18 δ -cDNA wurde in das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnittene Plasmid, das für das Cyan Fluoreszierende Protein (CFP) kodiert (pECFP, BD

Biosciences), einkloniert. Die RII α -cDNA wurde in das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnittene Plasmid, das für das Yellow Fluoreszierende Protein (YFP) kodiert (pEYFP, BD Biosciences), einkloniert. Die erhaltenen Plasmide kodieren somit für die Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP bzw. RII α -YFP. Escherichia coli-Bakterien (Stamm JM109) wurden mit der Plasmid-DNA transformiert. Die in den Bakterien vermehrte Plasmid-DNA wurde mittels der Qiagen-Midi-Plasmidpräparationsmethode entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) isoliert und mittels Transfektion in HEK293-Zellen eingeführt (s.u.).

HEK293-Zellen (GBF, Braunschweig) wurden auf Polylysin-beschichteten 30 mm-Deckgläschen in Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert, bis eine Konfluenz von 40 - 60 % erreicht war. Die Zellen wurden mittels der Lipofectamine-Methode (Gibco Invitrogen, Karlsruhe) mit den AKAP18 δ -CFP- und RII α -YFP-Plasmiden (1 - 2 μ g je DNA) transient transfiziert (Verhältnis von AKAP18 δ -CFP-:RII α -YFP-Plasmid-DNA von 1:4).

Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Messungen

HEK293-Zellen wurden transient mit den für RII α -YFP und AKAP18 δ -CFP kodierenden Plasmiden kotransfiziert. FRET-Messungen wurden 24 - 48 h nach der Transfektion an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Daten wurden mittels der Openlab 2.25 Software (Improvision, Coventry GB) gespeichert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 425 für CFP und 488 nm für YFP angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei Wellenlängen von 480/30 für CFP und 535/26 nm für YFP gemessen. FRET von CFP zu YFP wurde durch Anregung von CFP bei einer Wellenlänge von 425 nm und der Messung der Emission von YFP bei einer Wellenlänge von

535/26 nm bestimmt. Die unspezifische Hintergrundfluoreszenz wurde in einer Region ohne Zellen bestimmt und subtrahiert. Da die Einstellungen am Mikroskop unverändert blieben, konnte in allen Experimenten ein Verhältnis von $535/480 > 0,6$ als positives FRET-Signal bezeichnet werden.

Bei FRET-Experimenten müssen falsch-positive Signale ausgeschlossen werden. Diese sind darauf zurückzuführen, dass bei der Anregung von CFP auch YFP angeregt wird. Des Weiteren strahlt die CFP-Emission auch in den Bereich der YFP-Emission hinein. Das Kontrollexperiment zum Nachweis richtig-positiver FRET-Signale erfolgt durch ein Akzeptor-Ausbleichungs-Protokoll (donor recovery after acceptor bleaching). Das Experiment wurde an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wird bei einer Anregung von 425 nm die Emission bei 480/30 und 535/26 nm mit einer 12 bit CCD-Kamera (Imago, TILL-Photonics, Martinsried, Deutschland) erfasst. Nach Bestimmung der Basis-Signale erfolgt dann eine starke Anregung von YFP bei einer Wellenlänge von 488 nm, die zum Verlust des YFP-Emissionssignals führt (acceptor bleaching). Die Emission von CFP, die bei einer Wellenlänge von 480/30 nm bestimmt wird, steigt sofort an, da FRET unterbrochen wird (donor recovery). In diesem System musste YFP durch mehrmalige starke Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm ausgebleichen werden, da die Lichtquelle nicht energiereich genug ist. Das Ausbleichen und damit der Verlust des YFP-Emissionssignals geschieht somit stufenweise. Dadurch steigt die Emission von CFP, die bei einer Wellenlänge von 480/30 nm bestimmt wird, kontinuierlich und nicht in einem einzigen Schritt an. Der Anstieg der CFP-Emission wird daher über einen Zeitraum von etwa 120 sec nach Beginn der Akzeptor-ausbleichung gemessen.

Um die Spezifität des FRET weiter zu untersuchen und zu testen, ob sich die kotransfizierten HEK293-Zellen dazu eignen, membranpermeable Substanzen zu identifizieren, die die Interaktion zwischen RII α -YFP und AKAP18 δ -CFP modulieren, wurden die Zellen mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31 (100 μ M) inkubiert, das generell AKAP-RII-Interaktionen hemmt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem Peptid S-Ht31-P, das keinen Einfluss auf die AKAP-RII-Interaktion hat (Klußmann et al., J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999), inkubiert. FRET-Messungen wurden in Intervallen von 10 min über insgesamt 90 min durchgeführt.

Ergebnis

Zum direkten Nachweis einer Interaktion von AKAP18 δ und den regulatorischen RII α -Untereinheiten der PKA in vivo wurden HEK293 mit Plasmiden kotransfiziert, die für AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodieren. Fig. 2 belegt die Koexpression beider Proteine in den gleichen Zellen. Die Expression von RII α -YFP wurde durch Anregung bei 488 nm und Messung der emittierten Fluoreszenz bei 535/26 nm nachgewiesen (Fig. 2A), die von AKAP18 δ -CFP durch Anregung der Fluoreszenz bei 425 nm und Messung der emittierten Fluoreszenz bei 480/30 nm (Fig. 2B). Beide Fusionsproteine zeigten eine diffuse, zytosolische Verteilung. Anschließend wurden FRET-Messungen an den gleichen Zellen durchgeführt. Dazu wird der Donor CFP bei einer Wellenlänge von 425 nm angeregt. Hält sich ein geeigneter Akzeptor in seiner unmittelbaren Nähe auf (Abstand < 10 nm), führt die Anregung des Donors zu einem teilweisen Energietransfer auf den Akzeptor YFP, der dann bei einer Wellenlänge von 545 nm fluoresziert (schematische Darstellung in Fig. 3). Demnach wurden zum Nachweis von FRET die HEK293-Zellen (CFP) bei einer Wellenlänge von 425 nm angeregt und es wurde die Emission von YFP bei einer Wellenlänge von 535/26 nm gemessen. Fig. 2C zeigt eine

ähnliche Verteilung der dargestellten YFP-Emission wie in Fig. 2A. Somit hat ein Energietransfer von CFP nach YFP stattgefunden. Fig. 1D zeigt die farbkodierte Darstellung der berechneten Ratio 535/480 von etwa 1.2 - 1.5 der FRET-Signale in diesen Zellen.

Die Spezifität der gemessenen FRET-Signale wurde mittels des Akzeptor-Ausbleichungs-Protokolls überprüft. Fig. 4A beschreibt die Kinetik der von YFP und CFP emittierten Fluoreszenz. Dargestellt ist das Verhältnis von F/F_{\max} in Abhängigkeit von der Zeit (Zeit in sec). F_{\max} entspricht der maximalen Emission von YFP bzw. CFP. Vor der Akzeptor-ausbleichung beträgt die F/F_{\max} von YFP annähernd 1, die von CFP etwa 0,92. Die Akzeptorausbleichung, beginnend nach 40 sec, führt zu einer starken Abnahme des Emissionssignals von YFP. Die F/F_{\max} für CFP steigt von etwa 0.91 auf etwa 1 an. Aus dem Anstieg der CFP-Emission um etwa 10 % ergibt sich eine FRET-Effizienz von etwa 10 %. Die Regressionsanalyse (Fig. 4B) bestätigt diese Beobachtung. Diese Daten zeigen eine direkte Interaktion von AKAP18 δ und RII α .

Um die Spezifität der Interaktion von AKAP18 δ und RII α und damit des FRET weiter zu untersuchen, aber auch um zu testen, ob sich die kotransfizierten HEK293-Zellen dazu eignen, membranpermeable Substanzen zu identifizieren, die die Interaktion von AKAP18 δ und RII α modulieren, wurden FRET-Messungen in Gegenwart des membranpermeablen Peptids S-Ht31 durchgeführt. Dieses Peptid hemmt generell die Interaktion zwischen AKAP und regulatorischen PKA-Untereinheiten (Klussmann et al., J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999; s. schematische Darstellung Fig. 5A und B). Fig. 6A zeigt das farbkodierte FRET-Signal (Verhältnis 535/480) von AKAP18 δ zu RII α in zwei HEK293-Zellen. Vor der Zugabe von S-Ht31 (Zeitpunkt 0 min) betrug die Ratio 535/480 etwa 1.3. Eine Abnahme des Verhältnisses 535/480

(weniger rot) korreliert direkt mit der Abnahme der Interaktion von CFP und YFP. Die Zugabe von S-Ht31 (100 μ M, nach Zeitpunkt 0) induzierte eine Abnahme des Verhältnisses 535/480 nm um über 50 % innerhalb von 80 min. Der Mittelwert des Verhältnisses betrug etwa 0.35. Fig. 6B zeigt Zellen, die mit dem wirkungslosen Kontrollpeptid S-Ht31-P inkubiert wurden, das keinen Einfluss auf die AKAP-RII-Interaktion hat. Hier ändert sich das farbkodierte FRET-Signal kaum. Fig. 6C zeigt eine Zusammenfassung der erhaltenen Daten aus Fig. 6A und B. Dargestellt ist die Veränderung des FRET-Signals (in %) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Graphik zeigt die an den Zellen beobachtete Veränderung des FRET-Signals in Gegenwart von S-Ht31 oder S-Ht31-P.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HEK293-Zellen, die AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP koexprimieren, ein geeignetes System zur Identifizierung membranpermeabler Substanzen darstellen, die die Interaktion zwischen diesem AKAP und RII α inhibieren.

AKAP bindet regulatorische PKA-Untereinheiten über ein konserviertes Strukturmotiv (amphipathische Helix). Daher kann eine Interaktion jedes AKAP mit einer regulatorischen PKA-Untereinheit in diesem System mittels FRET bestimmt werden. Diese Möglichkeit bedeutet, dass das System für die Suche nach spezifischen, membranpermeablen Inhibitoren für jede AKAP-PKA-Interaktion nutzbar ist.

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend
 - a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 1,
 - b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
 - c) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
 - d) ein Nukleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
 - e) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.
2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unter c) angegebene Nukleotidsequenz mindestens 40 % homolog zu einer der unter a) angegebenen Nukleotidsequenz ist.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unter c) angegebene Nukleotidsequenz mindestens 60 %, vorzugsweise 70 %, bevorzugt 80 %, ganz besonders bevorzugt 90 % homolog zu einer der unter a) angegebenen Nukleotidsequenz ist.
4. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.
5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Polypeptid, kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
8. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.
9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, ein Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle

gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 und/oder ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, umfasst.

11. Kit,

dadurch gekennzeichnet, dass

er ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, ein Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 7, ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 10 umfasst.

12. Verfahren zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion umfassend die Schritte

- a) Bereitstellung eines (i) ersten Vektors umfassend ein erstes Nukleinsäuremolekül kodierend ein AKAP und einen ersten Marker und eines (ii) zweiten Vektors umfassend ein zweites Nukleinsäuremolekül kodierend eine regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase und einen zweiten Marker,
- b) Einführen des ersten und des zweiten Markers in eine Zelle, wobei die Zelle transfiziert wird und
- c) Durchführen einer Fluoreszenzresonanzenergietransfer-(FRET)-Messung, wobei die AKAP-PKA-Interaktion detektiert wird.

13. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass

die Interaktion zwischen AKAP und RII α , RII β , RI α und/oder RI β detektiert wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass ein AKAP und/oder ein PKA-Inhibitor identifiziert wird, indem das Verfahren jeweils mit und ohne Zusatz des zu untersuchenden Inhibitors durchgeführt wird und einen Hinweis auf den AKAP- und/oder PKA-Inhibitor gibt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein membranpermeables Molekül indentifiziert wird, indem ein Konjugat aus dem zu untersuchenden membranpermeablen Molekül und einem membranpermeablen AKAP-PKA-Inhibitor hergestellt wird und die AKAP-PKA-Interaktion mit und ohne Konjugat oder das Molekül detektiert wird.
16. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 4, eines Vektors nach Anspruch 5, einer Wirtszelle nach Anspruch 6, eines Polypeptids nach Anspruch 7, eines Erkennungsmoleküls nach Anspruch 8 oder 9, einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 10, eines Kits nach Anspruch 11 und/oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 15 zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion oder eines AKAP- und/oder PKA-Inhibitors und/oder eines membranpermeablen Peptids.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine für ein Proteinkinase A-Ankerprotein kodierende Nukleinsäuresequenz, eine Verwendung dieser Nukleinsäuresequenz in einem Fusionsprotein und ein Verfahren zur Bestimmung der Wechselwirkung des Proteinkinase A-Ankerproteins mit regulatorischen Unter-einheiten der Proteinkinase A sowie ein Verfahren zur Identifikation zellpermeabler Substanzen.

Fig. 1A

AKAP18δ**Aminosäuresequenz**

MERPAAGEIDANKCDHLSRGEEGTGDLETSPV
GSLADLPFAAVDIQDDCGLPDVPQGNVPQGNPKRSKENRGDRNDHVKKRK
KAKKDYQPNYFLSIPITNKKITAGIKVLQNSILRQDNRLTKAMVGDGSH
ITLLVMQLNEDEVNIGTDALLELKPFVVEILEGKHLTLPFHGIGTFQGO
VGFVKLADGDHVSALLEIAETAKRTFQEKILAGESRTFKPHLTFMKLSK
APMLWKKGVKIEPGLYEQFIDHRFGEEILYQIDLCSMLKKKQSNQYYHC
ESSIVIGEKRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQYLEETQNKQKQPG
GNSVKAEEGDRNGDGSNNRK

Nukleotidsequenz

ATGGAGCGCCCCGCGCGGGAGAAATAGATGCCAATAAGTGTGA
TCATTTATCAAGAGGAGAGGAAGGGACGGGGACCTGGAGACCAGCCCTG
TAGGTTCTCTGGCAGACCTGCCGTTTGCTGCCGTAGACATTCAAGATGAC
TGTGGACTCCCTGATGTACCTCAAGGAAATGTACCTCAAGGAAACCCAAA
GAGAAGCAAAGAAAATAGAGGCGACAGGAATGATCACGTGAAGAAGAGGA
AGAAGGCCAAGAAAAGATTATCAACCCAACTATTTCTGTCCATTCCAATC
ACCAACAAAAAGATTACAGCTGGAATTAAAGTCTTGCAAAATTCGATACT
GAGACAGGATAATCGATTGACCAAAGCCATGGTCGGCGACGGCTCCTTTC
ACATCACCTTGCTAGTGATGCAGCTATTAAACGAAGATGAAGTAAACATA
GGTACCGACGCGCTTTTGGAAGCTGAAGCCGTTTCGTTGAGGAGATCCTTGA
GGGGAAGCATCTGACTTTGCCCTTCCACGGGATTGGCACTTTCCAAGGTC
AGGTTGGCTTTGTGAAGCTGGCAGACGGAGATCACGTCAAGTGCCTCCTG
GAGATAGCAGAGACTGCAAAAAGGACATTTAGGAAAAAGGCATCCTGGC
TGGAGAAAGCAGAACTTTTAAGCCTCACCTGACCTTTATGAAGCTGTCCA
AAGCACCAATGCTCTGGAAGAAGGGAGTGAGAAAAATAGAGCCTGGATTG
TATGAGCAATTTATCGACCACAGATTTGGAGAAGAAATACTGTACCAAT
AGATCTCTGCTCCATGCTGAAGAAAAACAGAGCAATGGTTATTACCACT
GCGAGTCTTCGATCGTGATCGGTGAGAAGGACCGAAAGGAGCCTGAGGAT
GCTGAACTGGTCAGGCTCAGTAAGAGGCTGGTGGAGAACGCCGTGCTCAA
GGCTGTCCAGCAGTACCTAGAAGAGACACAGAACAAAAAGCAGCCGGGGG
AGGGGAACCTCCGTCAAAGCTGAGGAGGGAGATCGGAATGGCGATGGCAGT
GATAACAACCGGAAGTGA

Fig. 1B

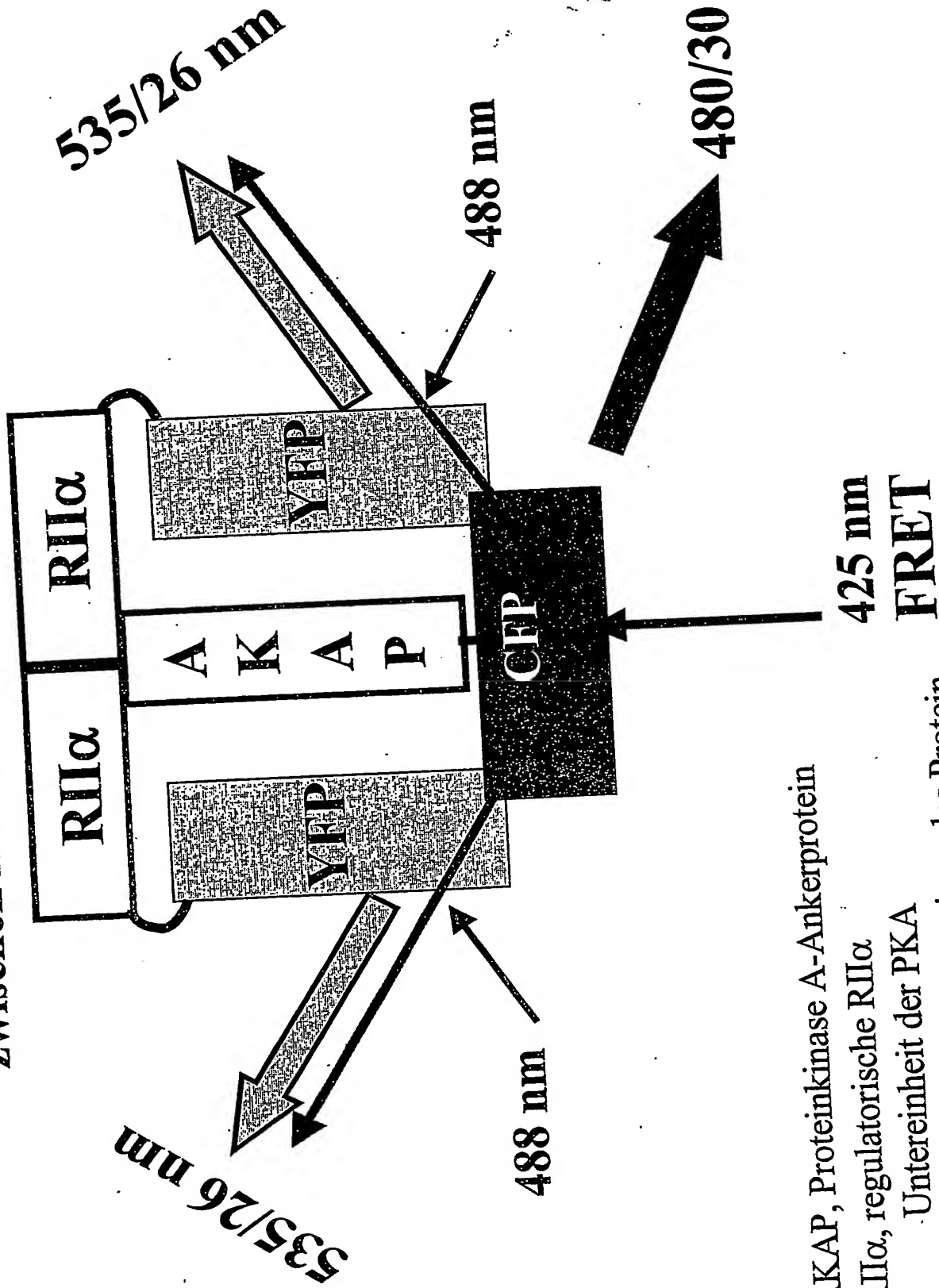
AKAP18δ	1	MERPAAGEIDANKCDHLRSGEEGTGGLTSPVGLADIPFAAVDIQDDCG
AKAP18γ	1	-----MSEEFKANTMDSLVDMPFATVDIQDDCG
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	51	EPDVPQGNVPOGNPKRSKENRGDRNDHVKKRKKAKKDYQPNYFLSIPITN
AKAP18γ	29	ITDEP-----QINLKRSQENNEWVKSQOVKKRKKKKKDYQPNYFLSIPITN
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	101	KKITAGIKVLONSITRODNRLTKAMVGDGSEHITLLVMQLLNEDEVNIGT
AKAP18γ	74	KETIKGIKVLONAITQODERLAKAMVSDGSEHITLLVMQLLNEDEVNIGI
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	151	DALLELKPFVEEELLECKHLLTPFHGIGTFQGVGFVKLADGDHVSALLLEI
AKAP18γ	124	DALLELKPFVEEELLECKHLLTPFHGIGTFGNQGVGFVKLADGDHVSALLLEI
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	201	AETAKRTFQEKGI LACESRIFKPHLTFMKLSKAPMLWKKGVKIEPGLYE
AKAP18γ	174	AETANRTFQEKGILVGESRSFKPHLTFMKLSKSPWLRKNGVKIEPDLYE
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	251	QFIDHRFGEEILYQIDLC SMLKKKQSNQYYHCSS-----I
AKAP18γ	224	KFISHRFGEEILYRIDLC SMLKKKQSNQYYHCSS-----I
AKAP18β	1	-----MGQLCCFPFSRDEGKISELESSSSAVLQRYSKDIPSW
mAKAP18α	1	-----MGQLCCFPFARDEGKICE-----
hAKAP18α	1	-----MGQLCCFPFSRDEGKISE-----
AKAP18δ	287	VIGEKDRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKKOPGEGNSV
AKAP18γ	260	VIGEKNGGEPDDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKNKPGE GSSV
AKAP18β	38	SSGEKNGGEPDDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKNKPGE GSSV
mAKAP18α	19	----KDRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKKOPGEGNSV
hAKAP18α	19	----KNGGEPDDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKNKPGE GSSV
AKAP18δ	337	KAEECDRNGEGSINNRK*
AKAP18γ	310	KTEAADQNGNDNENNRK*
AKAP18β	88	KTEAADQNGNDNENNRK*
mAKAP18α	65	KAEECDRNGEGSINNRK*
hAKAP18α	65	KTEAADQNGNDNENNRK*

Fig. 2

Die Interaktion von AKAP188-CFP und RII α -YFP



Fig. 3 Fluoreszenz-ResonanzEnergieTransfer (FRET)
zwischen AKAP18δ-CFP und RIIα-YFP



AKAP, Proteinkinase A-Ankerprotein
RIIα, regulatorische RIIα
Untereinheit der PKA
YFP, Yellow (gelb) fluoreszierendes Protein
CFP, Cyan (blau) fluoreszierendes Protein

25.11.03

Fig. 4A

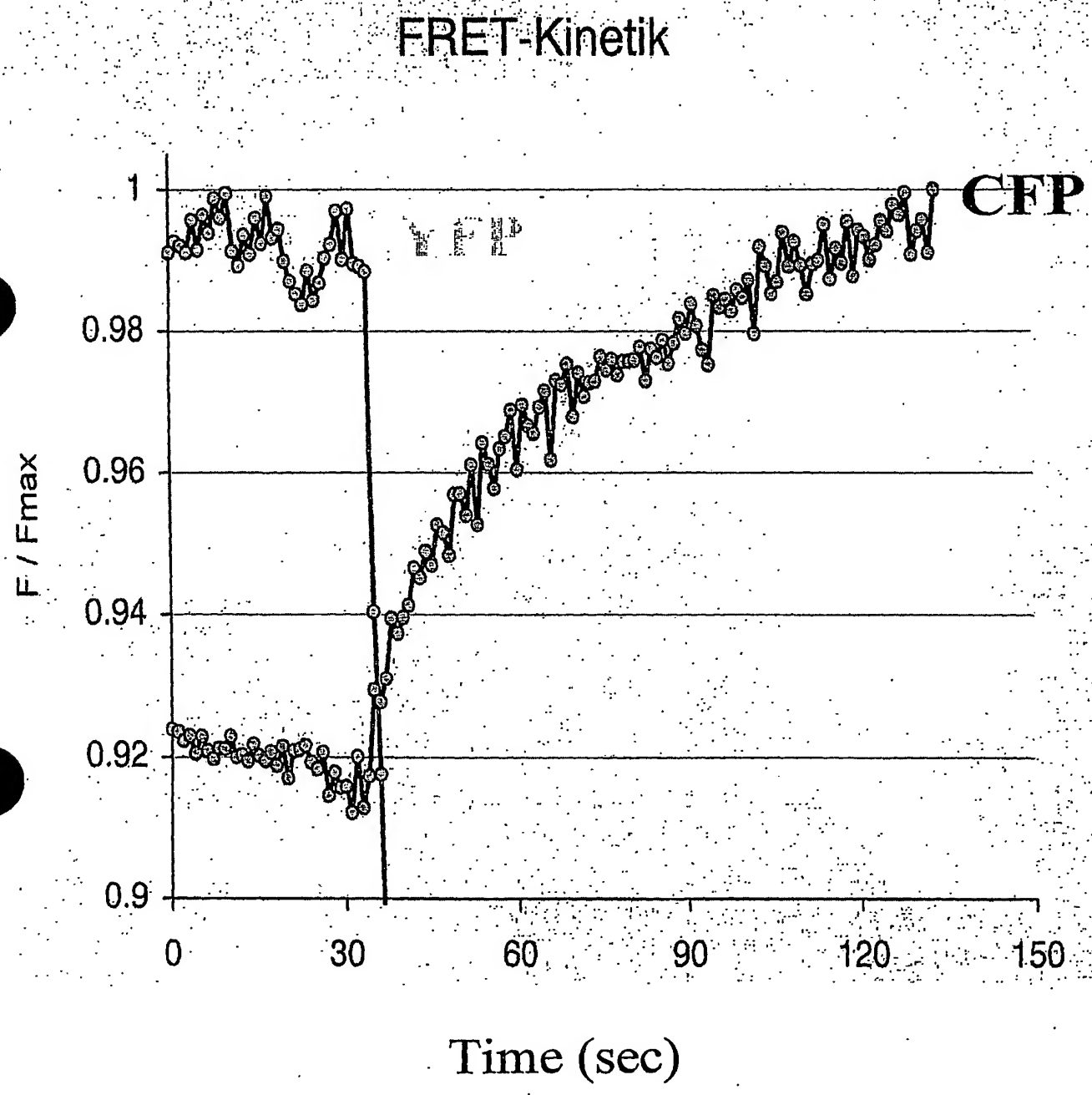


Fig. 4B

Die Ausbleichung des Akzeptors YFP
(RII α -YFP) führt zu einer Zunahme der vom
Donor CFP (AKAP18 δ -CFP) emitierten
Fluoreszenz

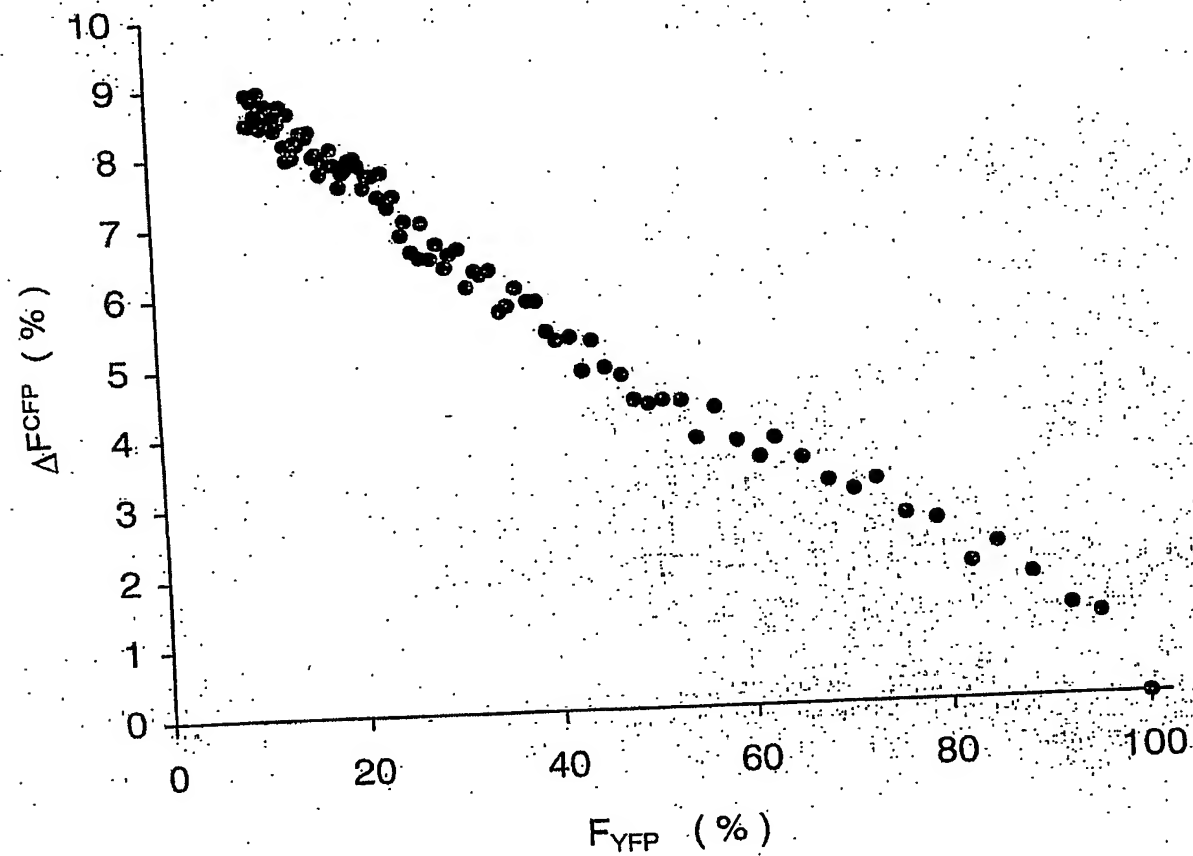
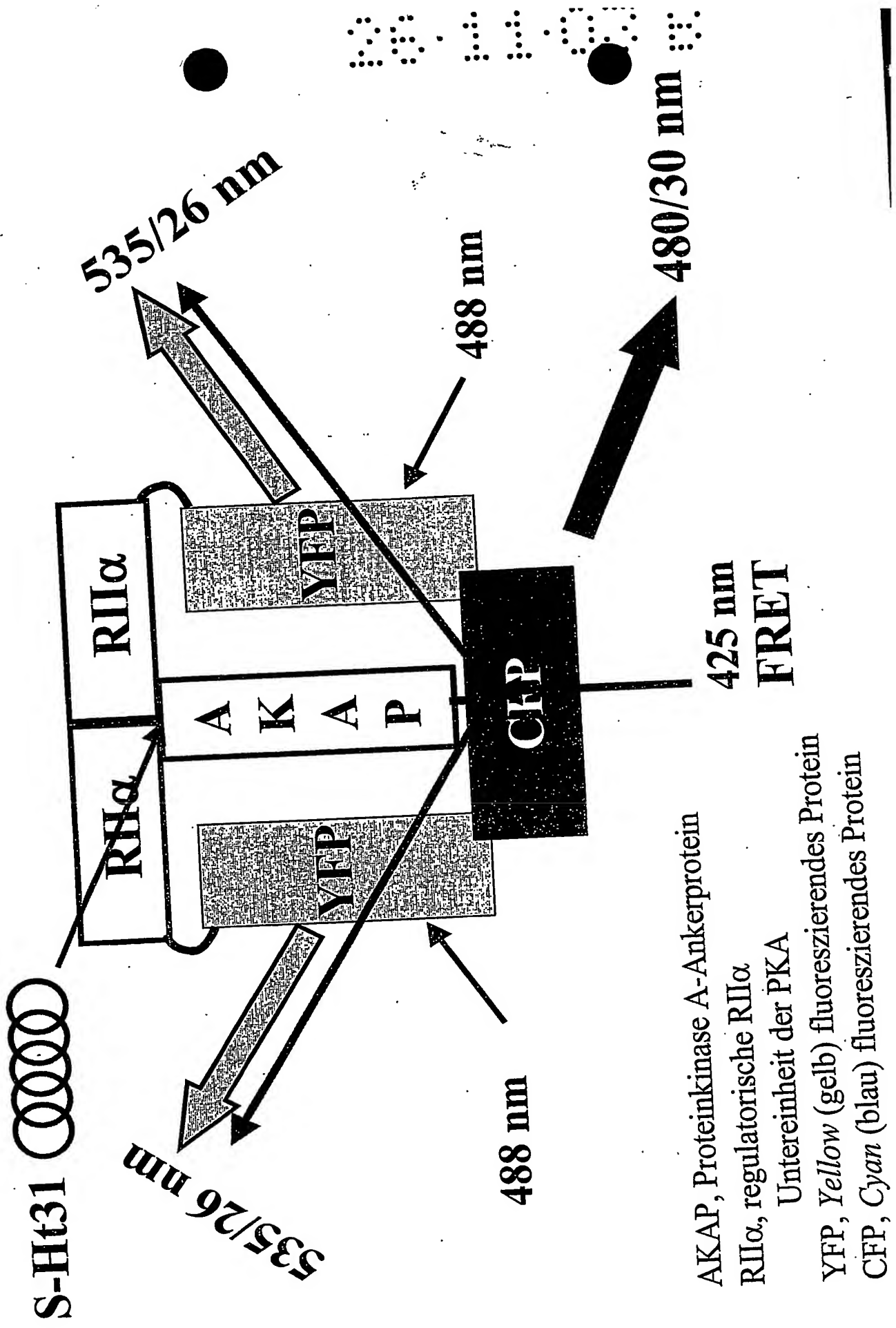


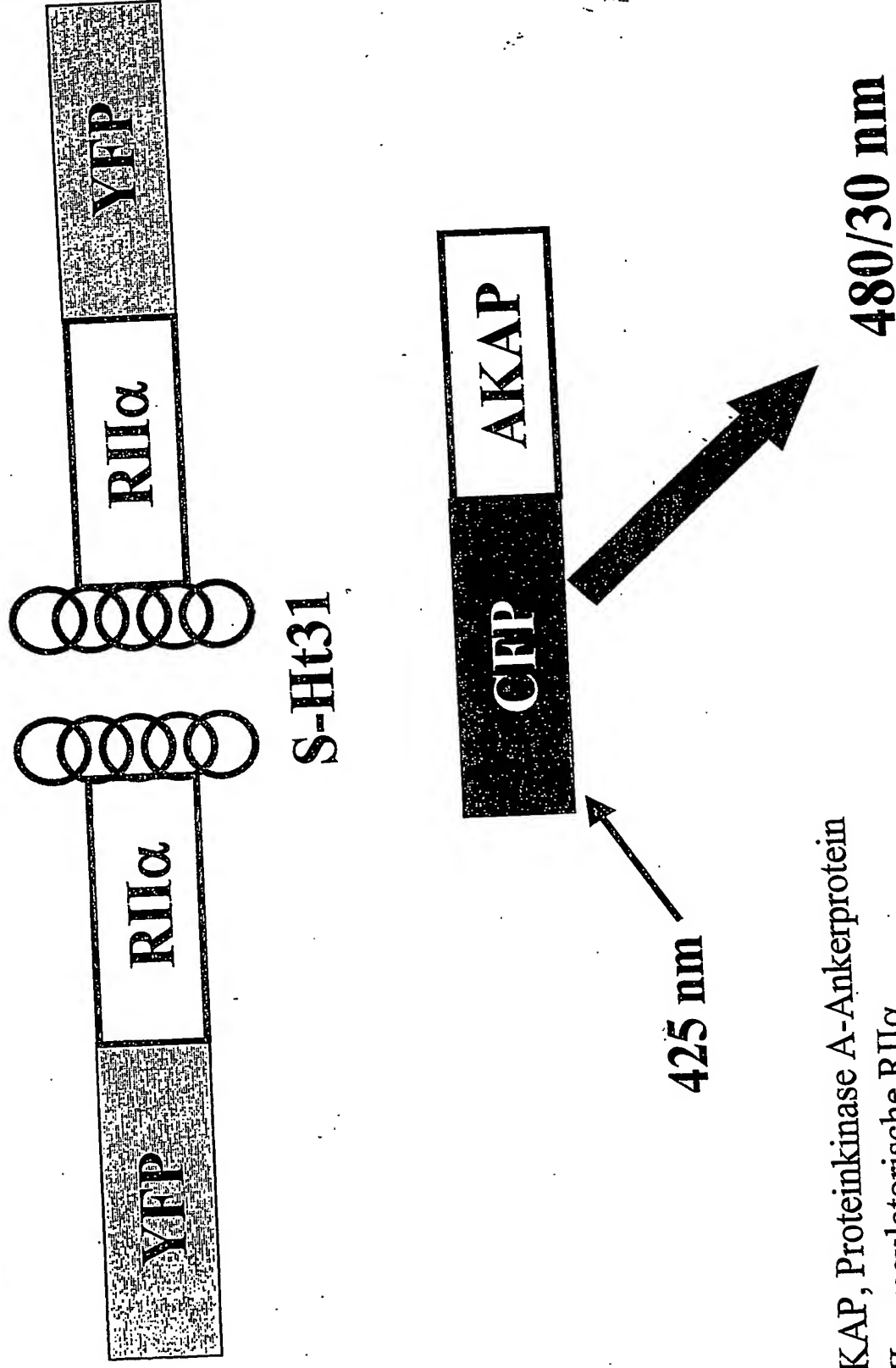
Fig. 5A **Hörmung der Interaktion von**
AKAP18δ-CFP und RIIα-YFP durch das Peptid S-Ht31



AKAP, Proteinkinase A-Ankerprotein
 RIIα, regulatorische RIIα
 Untereinheit der PKA
 YFP, Yellow (gelb) fluoreszierendes Protein
 CFP, Cyan (blau) fluoreszierendes Protein

Fig. 5B

Resultat der Hemmung der Interaktion
zwischen AKAP18δ-CFP und RIIα-YFP durch S-Ht31



AKAP, Protein kinase A-Ankerprotein

RIIα, regulatorische RIIα

Untereinheit der PKA

YFP, *Yellow* (gelb) fluoreszierendes Protein

CFP, *Cyan* (blau) fluoreszierendes Protein

Fig. 6A Inhibition der Interaktion von AK180-CFR mit AK180-YFP durch das Peptid S-Ht31 - Abnahme des FRET-Signals

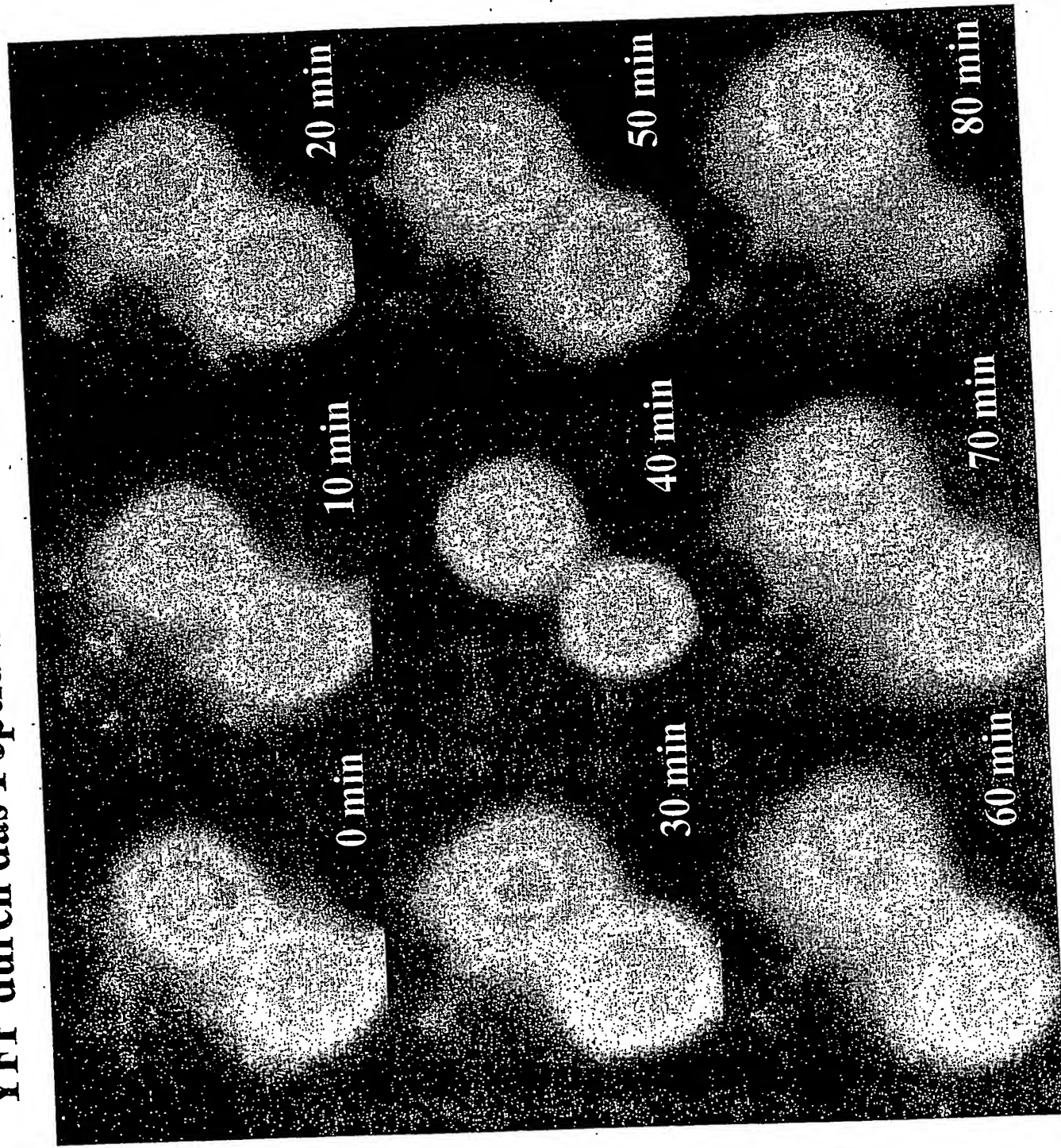


Fig. 6B Das Peptid S- β 1-P hemmt die Interaktion von ANXA IV
CFP und RIL α -YFP nicht - keine Abnahme des FRET-Signals

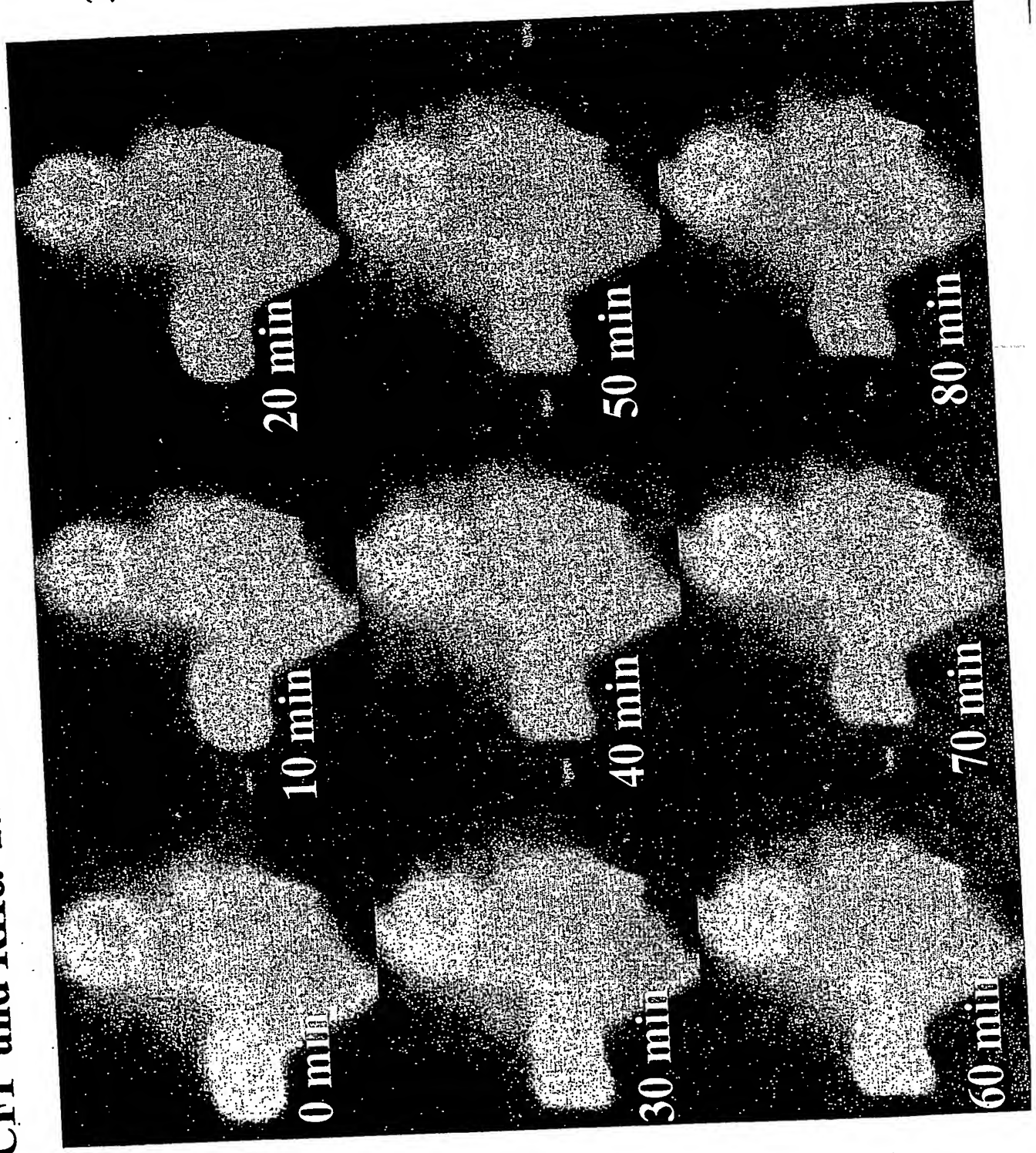
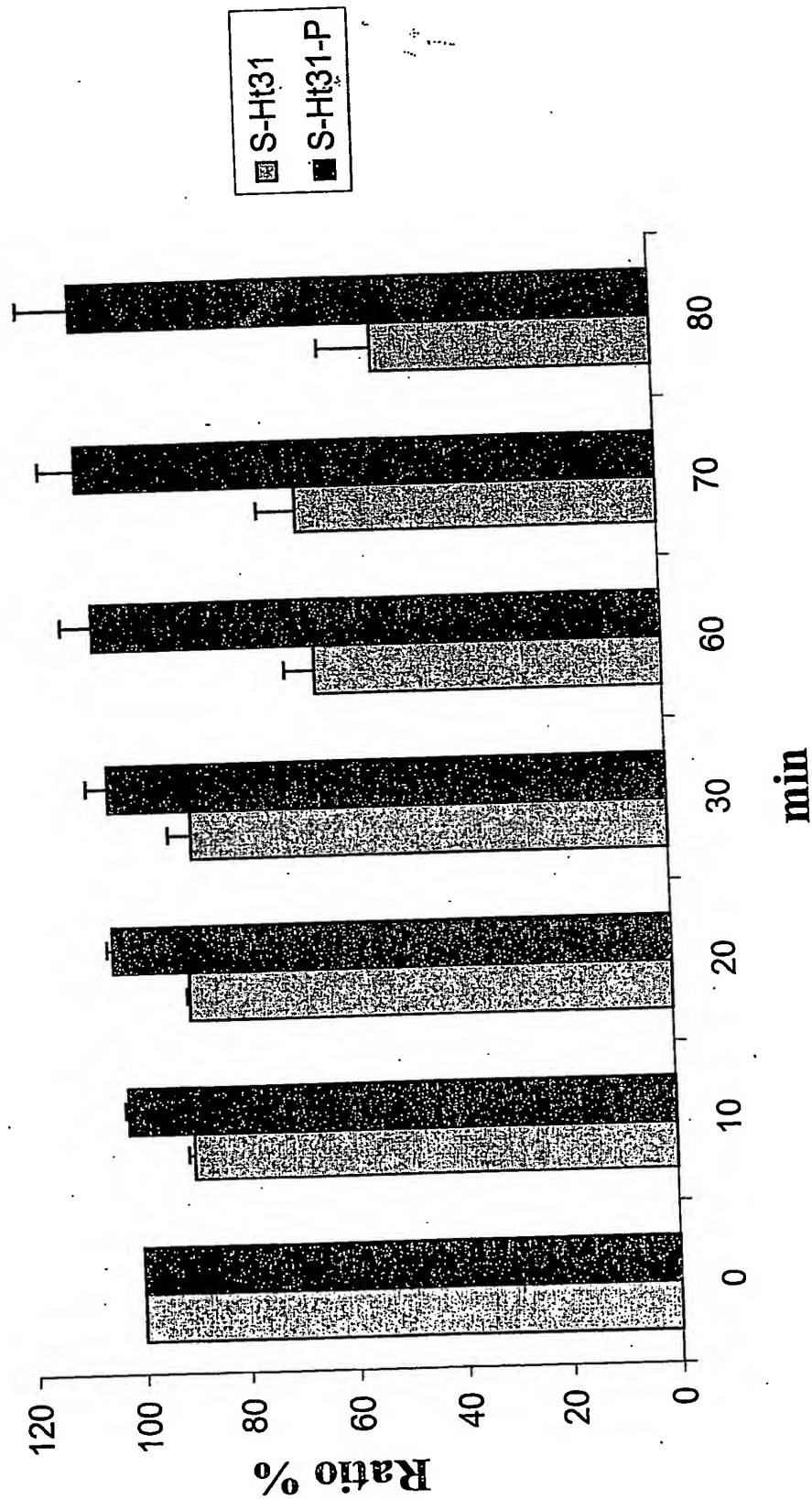


Fig. 6C

Veränderungen der FRET-Signale (Ratio 535/480) von
AKAP18 δ -CFP und RI α -YFP in HEK293-Zellen
in Gegenwart der Peptide S-Ht31 und S-Ht31-P



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.